

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 298 210  
A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **88106747.4**

(51) Int. Cl. 4: **G01N 33/531 , C07K 7/00 ,  
G01N 33/08**

(22) Anmeldetag: **27.04.88**

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: SP  
+ GR.

(30) Priorität: **02.05.87 DE 3714634**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**11.01.89 Patentblatt 89/02**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**  
**Postfach 80 03 20**  
**D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)**

Anmelder: **Max-Planck-Gesellschaft zur**  
**Förderung der Wissenschaften e.V.**  
**Bunsenstrasse 10**  
**D-3400 Göttingen(DE)**

(72) Erfinder: **Brocks, Dietrich, Dr.**  
**Goethering 9**  
**D-6200 Wiesbaden(DE)**  
Erfinder: **Timpl, Rupert, Dr.**  
**Julius-Haerlinstrasse 3**  
**D-8035 Gauting(DE)**

(54) **Verfahren zur selektiven immunologischen Bestimmung von intaktem Prokollagen Peptid (Typ III) und Prokollagen (Typ III) in Körperflüssigkeiten und Mittel zu dessen Durchführung.**

(57) Durch Immunisierung von Tieren mit einem Peptid der Sequenz

**I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P**

gebunden an ein immunogenes Protein können Antikörper gewonnen werden, mit deren Hilfe Prokollagen Peptid (Typ III) sowie Prokollagen Typ III in Körperflüssigkeiten selektiv bestimmt werden können.

**EP 0 298 210 A2**

## Verfahren zur selektiven immunologischen Bestimmung von intaktem Prokollagen Peptid (Typ III) und Prokollagen (Typ III) in Körperflüssigkeiten und Mittel zu dessen Durchführung

Prokollagen Peptid (Typ III) ist das aminotermi-  
nale Propeptid des Kollagen (Typ III), das nach  
Sezernierung des Prokollagen (Typ III)-Moleküls  
extrazellulär abgespalten wird. Mit einer  
radioimmunologischen Bestimmungsmethode, wie  
sie in der Europäischen Patentschrift Nr. 4940 be-  
schrieben ist, kann die Konzentration dieses Pro-  
kollagen Peptids in Körperflüssigkeiten bestimmt  
werden. Die Kenntnis der Serumkonzentration des  
Peptids erlaubt Aussagen über die Aktivität fibroti-  
scher Erkrankungen, wie z.B. der Leber [Rohde, H.  
et al. Eur. J. Clin. Invest 9, 451 - 459 (1979)].

Die exakte, selektive Bestimmung von Prokolla-  
gen Peptid (Typ III) in Serum und anderen Kör-  
perflüssigkeiten ist mit den bisher beschriebenen Me-  
thoden aber nicht möglich, da die polyklonalen  
Antikörper, die in diesen Methoden eingesetzt wer-  
den, mit verschiedenen, im Serum vorkommenden  
Antigenen, die zum Teil Abbauprodukte des Prokol-  
lagen Peptids (Typ III) darstellen, mit unter-  
schiedlicher, niedrigerer Affinität reagieren  
[Niemelä, O. et al. Clin. Chim. Acta 124, 39 - 44  
(1982)]. Dies führt dazu, daß die Serumverdün-  
nungskurven und die Verdünnungskurven anderer  
Körperflüssigkeiten zur Eichkurve, die mit reinem  
Prokollagen Peptid (Typ III) erstellt wird, nicht par-  
allel sind und daher von jeder unbekannten Probe  
der Antigengehalt in mehreren Verdünnungen be-  
stimmt werden muß, um die Antigenkonzentration  
über den 50 % Interzept der Verdünnungskurve zu  
ermitteln.

Ein weiterer Nachteil dieser Verfahren ist, daß  
aufgrund einer zu geringen Kreuzreaktivität der An-  
tikörper mit Ratten- bzw. Mäuseantigen eine Be-  
stimmung der Antigenkonzentration in Körperflüs-  
sigkeiten dieser Spezies nicht möglich war.

Mit Hilfe des Verfahrens, das von Schuppan et  
al. [J. Hepatol. 3, 27-37 (1986)] beschrieben wurde,  
kann die Konzentration der Antigene im Rattense-  
rum bestimmt werden. Allerdings hat dieses Ver-  
fahren den gleichen auch bei der Methode für  
Humanseren beschriebenen Nachteil [Niemelä et  
al. Clin. Chim. Acta 124, 39 - 44 (1982)] der nicht  
parallelen Inhibitionskurven bei verschiedenen Kör-  
perflüssigkeiten.

Mit Hilfe des Verfahrens der Europäischen  
Patentanmeldung 0089008 ist es möglich, dieses  
technische Problem zu lösen, indem Antikörper  
eingesetzt werden, die für intaktes Prokollagen  
Peptid (Typ III) und sein Abbauprodukt Col 1 ver-  
gleichbare Affinität haben. Mit diesem Verfahren  
werden intaktes und degradiertes Prokollagen Pep-  
tid (Typ III) gemeinsam bestimmt, was jedoch zur  
Ungenauigkeit in der diagnostischen Aussage führt,

da Normalkollektiv und Patientenkollektiv stark  
überlappen können.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß  
bei Verwendung eines Peptids mit einer bestimm-  
ten Aminosäuresequenz für die Immunisierung An-  
tikörper erhalten werden können, mit Hilfe derer  
eine spezifische Bestimmung des intakten Prokol-  
lagen Peptids (Typ III) möglich ist. Mit diesen Anti-  
körpern kann überraschenderweise auch der Pro-  
kollagen Peptid (Typ III)-Gehalt in Körperflüssig-  
keiten von Ratte oder Maus bestimmt werden, was für  
die tierexperimentelle Erprobung fibrosuppressiver  
Substanzen von Nutzen ist.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur  
immunologischen Bestimmung von aminotermi-  
nalem Prokollagen Peptid (Typ III) mit Antikörpern,  
das dadurch gekennzeichnet ist, daß

a) Tiere mit einem Peptid der Sequenz

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P,

gebunden an ein immunogenes Protein  
immunisiert werden,

b) aus dem Serum die Antikörper gewonnen  
werden, die mit intaktem aminoterminalen Prokol-  
lagen Peptid (Typ III) reagieren und

c) die Menge des aminoterminalen Prokol-  
lagen Peptids (Typ III) und des Prokollagens (Typ III)  
über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex  
bestimmt wird.

Ferner betrifft die Erfindung Antikörper, die  
durch Immunisierung von Tieren mit obengenan-  
ntem Peptid entstehen, das an ein immunogenes  
Protein gebunden ist.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert be-  
schrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Aus-  
führungsformen. Ferner wird die Erfindung in den  
Ansprüchen definiert.

Zur Herstellung der Antikörper werden Tiere,  
bevorzugt Nagetiere, wie z.B. Kaninchen, Meer-  
schweinchen, oder Ziege und Schaf mit dem Pep-  
tid der Sequenz

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

gekoppelt an ein geeignetes immunogenes Protein  
in Gegenwart von komplettem Adjuvans immuni-  
siert. Besonders bevorzugt werden Kaninchen ein-  
gesetzt. Mit wiederholten Sekundärintjektionen, bei-  
spielsweise im Abstand von 4 bis 8 Wochen, wird  
die Immunantwort verstärkt. Der Erfolg der Immuni-  
sierung wird durch Bestimmung der Konzentration  
von Antikörpern im radioimmunologischen Bin-  
dungstest kontrolliert [R. Timpl und L. Risteli, Im-  
munochemistry of the extracellular matrix, H. Furth-  
mayr Ed., Vol. 1, 199 (1982)].

Geeignete Proteine, an die das genannte Pep-  
tid gebunden sein kann sind alle immunogenen

Proteine. Bevorzugt werden Hämocyanin, Albumin oder Polylysin verwendet. Das Peptid kann nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt werden, wie z.B. von G. Barany und A. B. Merrifield in The Peptides Vol. 2, pp 3-254 (1980), Academic Press oder E. Brown, R. C. Sheppard und B. J. Williams, J. Chem. Soc. Perkin Transact.1, 1161 (1983) beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können als Serum oder gereinigt in verschiedenen immunologischen Verfahren, einschließlich allen Formen des Radioimmunassays, z.B. sequentielle Sättigungsanalyse oder Gleichgewichtsanalyse, gegebenenfalls nach Markierung mit Chloramin T oder Bolton-Hunter-Reagenz [Felber, Meth. Biochem. Anal. 22, 1 (1974); Shelley et al., Clin. Chem. 19, 146 (1975)] sowie in anderen kompetitiven Bindungsassays, wie Fluoreszenz-, Enzymimmunoassay, Chemiluminestenz oder anderen Immunoassays verwendet werden. Die Antikörper können daher in immunologischen Verfahren zur Isolierung und Charakterisierung sowie zur quantitativen Bestimmung von Prokollagen Peptid (Typ III) in Geweben und Körperflüssigkeiten eingesetzt werden. Zur quantitativen Bestimmung verfährt man nach den dem Fachmann an sich bekannten Methoden, indem eine flüssige Probe, die Prokollagen Peptid (Typ III) enthält, mit den erfindungsgemäßen Antikörpern zur Reaktion gebracht wird und die Menge des Prokollagen Peptids (Typ III) über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt wird. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Prokollagen Peptid (Typ III) noch mit dem Amino-terminus des Prokollagen (Typ III) verknüpft ist oder nicht. Die bislang bei der immunologischen Bestimmung störenden Degradationsprodukte des Prokollagen Peptids (Typ III), insbesondere das Col 1, werden von den erfindungsgemäßen Antikörpern nicht miterfaßt.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung weitergehend erläutert. Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, wenn nicht anders angegeben.

### Beispiel 1

#### Herstellung der Peptid-Hämocyanin Konjugat-Verbindung

100 mg Hämocyanin (dialysiert gegen 5 x 3 l Wasser und dann lyophilisiert) löst man in 3 ml Wasser und gibt 24 mg des Peptids I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P zu. Unter Rühren bei Raumtemperatur setzt man im Verlauf von 2 Stunden in Portionen insgesamt 1 g N-Cyclohexyl-N'-[2-(4-morpholi-

nyl)-ethyl]carbodiimid-methyl-p-toluolsulfonat zu. Nach Rühren über Nacht dialysiert man das Reaktionsgemisch 24 Stunden gegen insgesamt 5 x 10 l Wasser, und isoliert das Produkt anschließend durch Gefriertrocknung. Man erhält 137 mg der Konjugatverbindung.

### Beispiel 2

#### Radioimmunbindungstest

300 µl Antiserum vom Kaninchen, immunisiert mit dem gemäß Beispiel 1 hergestellten Konjugat, in geeigneter Verdünnung werden mit 100 µl einer Prokollagen Peptid Typ III Lösung (1 ng Protein/100 µl, hergestellt wie in EP 4940, Beispiel 1, beschrieben), welches mit <sup>125</sup>J radioaktiv markiert ist, über Nacht inkubiert. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch Zugabe eines gegen Immunglobulin G der zur Immunisierung verwendeten Spezies gerichteten Antiserums einer anderen Spezies ausgefällt. Nach Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes wird die Menge der präzipitierten Radioaktivität im γ-Szintillationsspektrometer bestimmt.

### Beispiel 3

#### Radioimmun-Test

0,2 ml der zu analysierenden Probe oder des Prokollagen Peptid (Typ III)-Standards werden mit einer in Bezug auf die Menge des markierten Antigens limitierenden Menge von Antiserum (in 0,1 ml Puffer) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml <sup>125</sup>J markiertem Prokollagen Peptid (Typ III) (enthält 1 ng Protein) wird 6 - 8 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels eines gegen IgG der zur Immunisierung verwendeten Spezies gerichteten Antiserums präzipitiert. Nach Abzentrifugation und Dekantierung des Überstandes wird die gefällte Radioaktivität im γ-Szintillationsspektrometer bestimmt.

Durch Vergleich mit einer Eichkurve, zu deren Erstellung Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen von Prokollagen Peptid (Typ III) eingesetzt werden, kann dann die Konzentration von Prokollagen Peptid (Typ III) in der unbekannten Lösung bestimmt werden.

## Beispiel 4

### Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der mit dem erfindungsgemäßen Antikörpern reagierenden Antigene im Serum von z.B. Rind und vom Schwein

1 ml Serum werden per Gelfiltrationsschromatographie über eine Sephacryl S 300® Säule (1,6 x 130 cm), äquilibriert in "phosphate buffered saline" PBS mit 0,04 % Tween 20, aufgetrennt. Je 0,2 ml der Fraktionen (jede 2,8 ml) werden in den Radioimmun-Test nach Beispiel 3 eingesetzt.

Abb 1a zeigt das Elutionsprofil des Antigens aus Schweineserum, Abb. 1b das des Antigens aus Rinderserum im Vergleich zum Profil des nach EP 4940 bestimmten Antigens. Die Peaks 1/1a entsprechen intaktem Prokollagen Typ III bzw. pN-Kollagen Typ III (Prokollagen, dem das C-terminale Ende fehlt); Peaks 2/2a entsprechen intaktem aminoterminalen Prokollagen Peptid Typ III; Peaks 3/3a entsprechen Col 1 sowie Abbauprodukten des aminoterminalen Prokollagen Peptids Typ III mit gleichem Molekulargewicht wie Col 1.

## Ansprüche

1. Verfahren zur immunologischen Bestimmung von aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) mit Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß

a) Tiere mit einem Peptid der Sequenz

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

gebunden an ein immunogenes Protein immunisiert werden,

b) aus dem Serum die Antikörper gewonnen werden, die mit intaktem aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) reagieren und

c) die Menge des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) und/oder des Prokollagen Typ III über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid an Hämocyanin, Albumin oder Polylysin gebunden ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Nagetiere oder Ziege oder Schaf immunisiert werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Kaninchen immunisiert werden.

5. Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit dem Peptid der Sequenz

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

gebunden an ein immunogenes Protein.

6. Antikörper nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid an Hämocyanin, Albumin oder Polylysin gebunden ist.

7. Antikörper nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß Nagetiere oder Ziege oder Schaf immunisiert werden.

8. Antikörper nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Kaninchen immunisiert werden.

9. Verbindung bestehend aus dem Peptid der Sequenz

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

gebunden an ein immunogenes Protein.

10. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 9 als Antigen.

Patentansprüche ES und GR:

1. Verfahren zur immunologischen Bestimmung von aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) mit Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß

a) Tiere mit einem Peptid der Sequenz

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

gebunden an ein immunogenes Protein immunisiert werden.

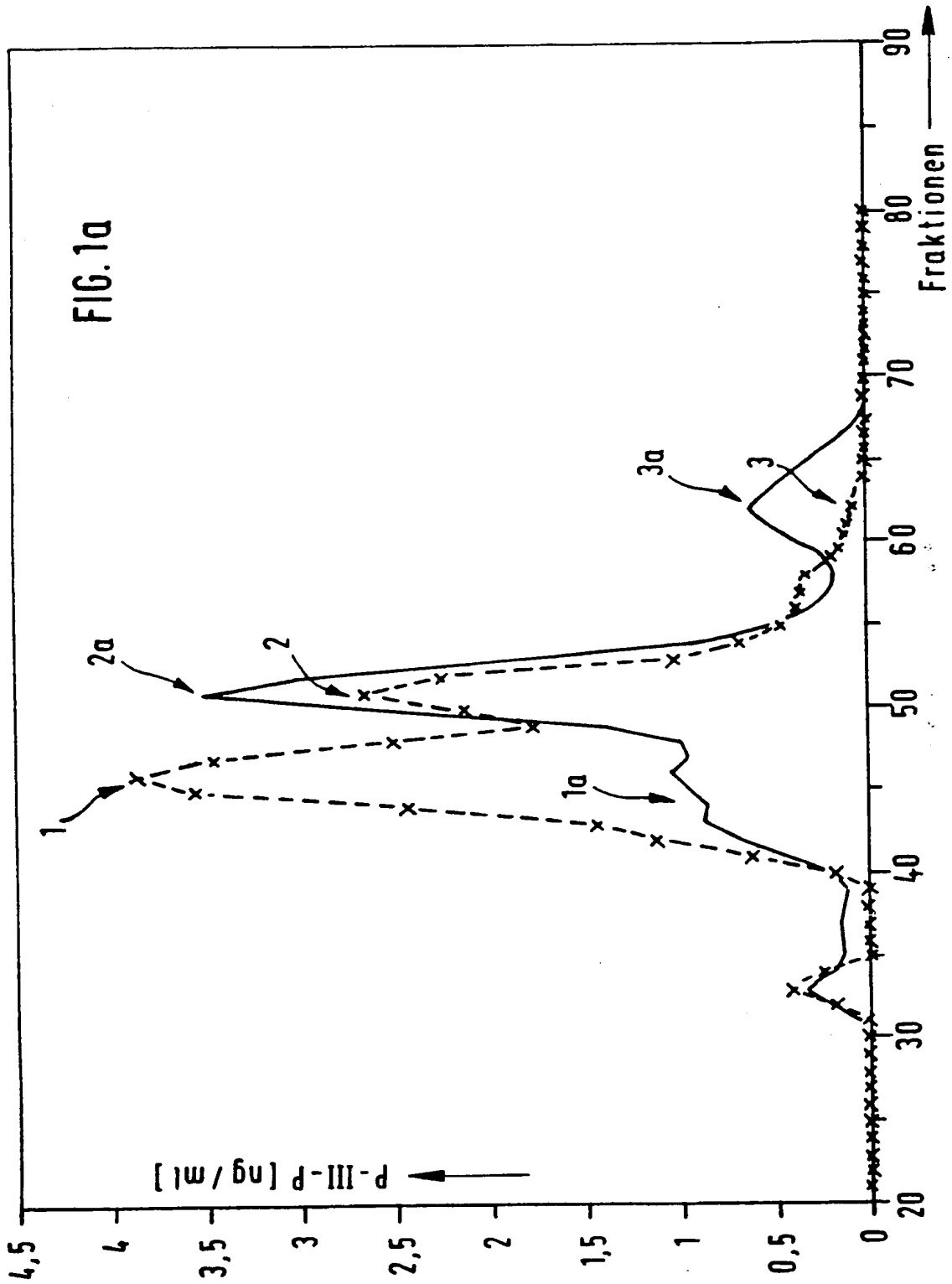
b) aus dem Serum die Antikörper gewonnen werden, die mit intaktem aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) reagieren und

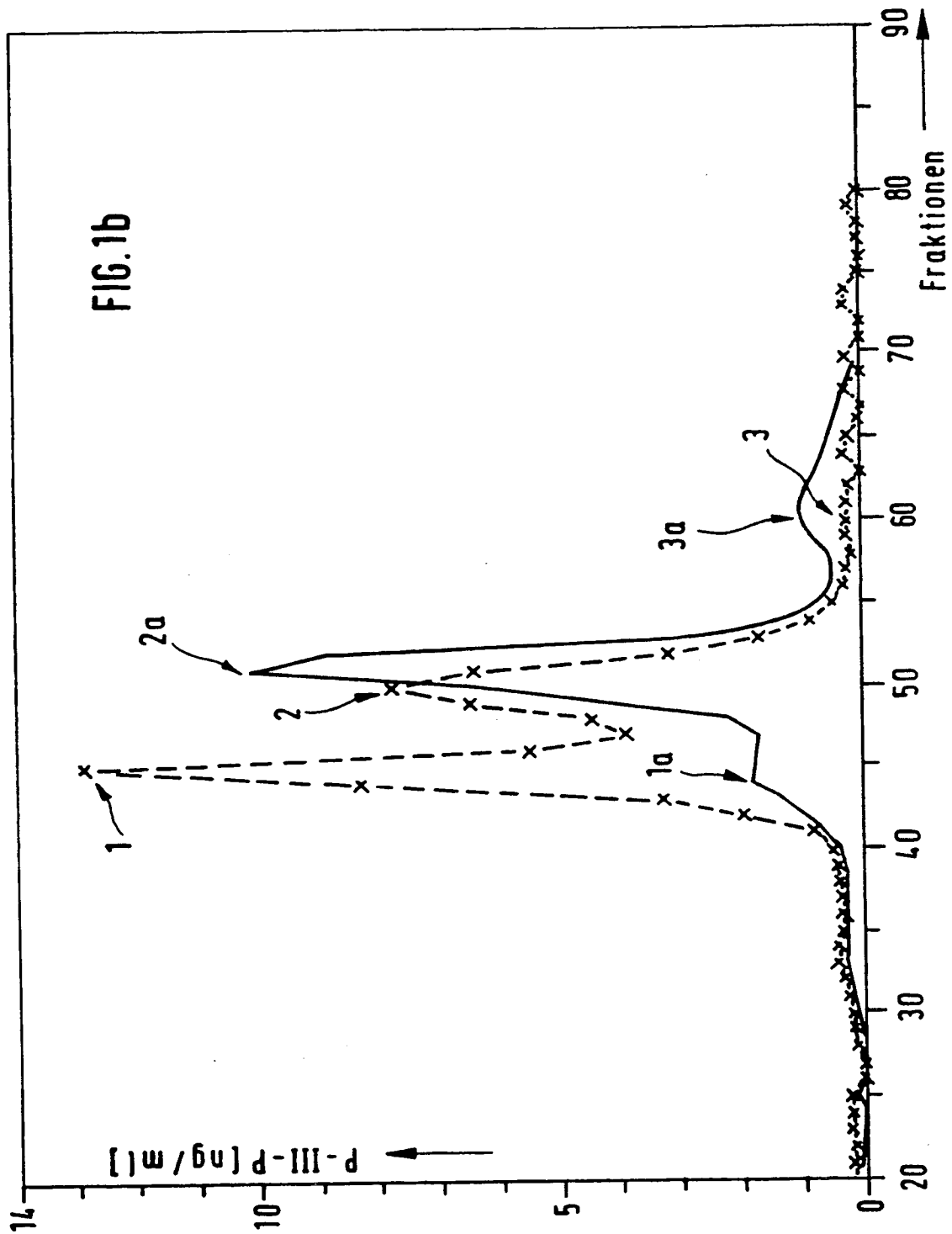
c) die Menge des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) und/oder des Prokollagen Type III über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid an Hämocyanin, Albumin oder Polylysin gebunden ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Nagetiere oder Ziege oder Schaf immunisiert werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Kaninchen immunisiert werden.







Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 298 210 A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 88106747.4

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **G01N 33/531**, C07K 7/00,  
**G01N 33/08**

(22) Anmeldetag: 27.04.88

(30) Priorität: 02.05.87 DE 3714634

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
11.01.89 Patentblatt 89/02

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 15.05.91 Patentblatt 91/20

(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**  
**Postfach 80 03 20**  
**W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)**

Anmelder: **Max-Planck-Gesellschaft zur**  
**Förderung der Wissenschaften e.V.**  
**Bunsenstrasse 10**  
**W-3400 Göttingen(DE)**

(72) Erfinder: **Brocks, Dietrich, Dr.**  
**Goethering 9**  
**W-6200 Wiesbaden(DE)**  
Erfinder: **Timpl, Rupert, Dr.**  
**Julius-Haerlinstrasse 3**  
**W-8035 Gauting(DE)**

(54) **Verfahren zur selektiven immunologischen Bestimmung von intaktem Prokollagen Peptid (Typ III) und Prokollagen (Typ III) in Körperflüssigkeiten und Mittel zu dessen Durchführung.**

(57) Durch Immunisierung von Tieren mit einem Peptid der Sequenz

**I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P**

gebunden an ein immunogenes Protein können Antikörper gewonnen werden, mit deren Hilfe Prokollagen Peptid (Typ III) sowie Prokollagen Typ III in Körperflüssigkeiten selektiv bestimmt werden können.

**EP 0 298 210 A3**



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 10 6747

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
D,A	EP-A-0 004 940 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFT) * Patentansprüche *	1	G 01 N 33/531 C 07 K 7/00 G 01 N 33/68
A	EP-A-0 089 008 (HOECHST AG) * Patentansprüche *	1	
A	CLINICAL CHEMISTRY, Band 31, Nr. 8, 1985, Seiten 1301-1304; O. NIEMELÄ: "Radioimmunoassays for type III procollagen amino-terminal peptides in humans" * Insgesamt *	1	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 97, Nr. 1, 5. Juli 1982, Seite 444, Zusammenfassung Nr. 4431s, Columbus, Ohio, US; N. SUNDARRAJ et al.: "Development and characterization of monoclonal antibodies to human type III procollagen", & BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 1982, 106(1), 48-57 * Insgesamt *	1	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Band 83, Nr. 6, 1987, Seite AB-267, Zusammenfassung Nr. 52561, Philadelphia, PA, US; H. KONDO: "Establishment of mouse monoclonal antibodies against amino terminal peptide of type III procollagen and their use for a histochemical study in the human liver", & JPN. J. GASTROENTEROL. 83(10): 2174-2180, 1986 * Insgesamt *	1	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
			G 01 N C 12 P A 61 K
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
Den Haag		28 Februar 91	OSBORNE H.H.
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument &amp;: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			